

①Int. Cl.⁴G 01 N 33/531
C 12 N 15/00

識別記号

庁内整理 号

Z-7908-2G
8412-4B

④公開 昭和63年(1988)5月18日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

発明の名称 DNAの分子量測定用標準マーカー

①特 願 昭61-148891

②出 願 昭61(1986)6月25日

③発 明 者 石 和 浩 美 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社
内④発 明 者 柴 原 春 恵 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社
内

⑤出 願 人 株式会社ヤクルト本社 東京都港区東新橋1丁目1番19号

⑥代 理 人 弁理士 尾崎 光三

明 細 書

標準マーカー。

1. 発明の名称

DNAの分子量測定用標準マーカー

2. 特許請求の範囲

(1) プラスミドpHT300PLEに対して唯一の制限酵素切斷部位を有する制限酵素によって当該pHT300PLEを切斷して得られる1,870bpのDNA断片と、当該pHT300PLEを制限酵素ElaIによって切斷して得られる2,810bp、1,300bp、880bp、400bp、287bp及び80bpの6種類のDNA断片と、当該pHT300PLE由来のプラスミドpHT300.2PLEを制限酵素ElaIによって切斷して得られる1,300、1,107、920、650、400、287及び80bpの7種類のDNA断片とを、混合して成るDNAの分子量測定用標準マーカー。

(2) プラスミドpHT300PLEに対して唯一の制限酵素切斷部位を有する制限酵素が、ElaIである特許請求の範囲第1項記載DNAの分子量測定用

3. 発明の詳細を説明

<産業上の利用分野>

本発明は、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル電気泳動等によりDNAの分子量を測定する場合に適用されるDNAの分子量測定用標準マーカーに関するものであり、更に詳しくは、高分子量領域から低分子量領域に至る広い分子量領域にわたって適度に分散分布した数個のバンドをゲル上に明確に形成し得るDNAの分子量測定用標準マーカーに関するものである。

<従来の技術及びその問題点>

従来、アガロースゲル電気泳動、アクリルアミドゲル電気泳動等に代表されるゲル電気泳動により、DNAの分子量を測定する場合にスタンダード(参照用標準)として使用される分子量測定用標準マーカー(以下、分子量マーカーという)が、種々、開発されているが、実際には、DNAの分子

0452

用可能な分子量マーカーは比較的少なく、一般に、低分子量領域で優れた分岐分特性を示す低分子量マーカーと、高分子量領域で同様の特性を示す高分子量マーカー等を、適宜、選択し、利用目的に応じて、各々組み合わせて使用することが一般的な使用方法となっている。

現在、広く普及している分子量マーカーとして、例えば、 $\phi \times 17487$ を制限酵素 E_{A} で切断して作成されたものや、 λ ファージ DNA を制限酵素 E_{A} で切断して作成されたもの等があるが、前者は、低分子量領域において優れた分岐分特性を示すが、アガロースゲル電気泳動に用いると、泳動バンドが接近していて分別が不明瞭となる傾向があり、また、後者は、28bp以上の高分子量領域で有効であるが、低分子量領域における分子量マーカーとしては不適当である。

このように、使用する分子量領域に応じて、使用可能な分子量マーカーが限られているために、実際に、適当な分子量マーカーを選択し、各々、

<問題点を解決するための手段>

すなわち、本発明は、アガロースゲル電気泳動等に適用可能で、より広い分子量領域において使用することのできる DNA の分子量測定用標準マーカーを提供することを目的とするものである。

そして、このような目的を達成するために採用される本発明の構成は、①プラスミド pHT300PLE に対して唯一の制限酵素切断部位を有する制限酵素によって菌株 pHT300PLE を切断して作成される 4,875bp の DNA 断片と、②菌株 pHT300PLE を制限酵素 E_{A} によって切断して作成される 2,815bp、1,355bp、855bp、455bp、257bp 及び 85bp の 6 種類の DNA 断片と、③菌株 pHT300PLE 由来のプラスミド pHT300.7PLE を E_{A} によって切断して作成される 1,355、1,107、925、655、455、257 及び 85bp の 7 種類の DNA 断片とを混合して成るものである。

ここで、前記③記載のプラスミド pHT300PLE に対して唯一の制限酵素切断部位を有する制限酵素としては、例えば、 E_{A} が好適に使用されう

る。また、 λ ファージ DNA の場合、より広い分子量領域にわたって適用可能な広域分子量マーカーがあれば、その有用価値は大きなものである。その上、従来、多く、分子量マーカーは、その製造工程において高度技術と設備を要することが必要とされることから、生産コストが極めて高く、コスト面からも、より簡便性の高い製造技術を開発することが強く要請されている状況にあった。

分子量マーカーについてのこのような問題点を検討すると共に、本発明者は、より広い分子量領域において適用可能な優れた分子量マーカーを開発すべく鋭意研究開発を積み重ねた結果、プラスミド pHT300PLE 及び菌株 pHT300PLE 由来の pHT300.7PLE 等、各々特定の制限酵素により切断して得られる DNA 断片の混合物が、このような分子量マーカーとして好適であることを見出し、本発明を完成するに至った。

る。

出発材料として使用するプラスミド pHT300PLE は、公知・入手可能（農工研発第 744 号として通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に寄託）のものであり、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のプラスミド pACYC177 と、ストレプトコッカス・フェカリス (*Streptococcus faecalis*) 由来のプラスミド p15a1 を組み立て作成された複合プラスミド pHT400 から公知手段により作成される (Jpn. J. Genet. 12, 235-243(1985) 参照)。

また、前記③記載のプラスミド pHT300.7PLE は、以下の工程により菌株 pHT300PLE から作成される。すなわち、プラスミド pHT300PLE を制限酵素 E_{A} 1 及び E_{B} 27 により切断して得られる 2 種類の DNA 断片のうち低分子量の断片と、前記複合プラスミド pHT400 断片で公知手段により作成された pHT340 を E_{A} 1 及び E_{B} 27 により切断して得られる 2 種類の DNA 断片のうち高分子量の断片とを連結して pHT300.7PLE を作成する工程を経て、次いで、菌株 pHT300.7PLE の E_{A} 1 切断部位に、

なお、前記 pHT300.7PLE の作製は、従来、公知の手段により実施される (Jpn. J. Genet. 11, 405-408 (1985) 参照)。そして、この pHT300.7PLE は、制限酵素 EcoI による切断部位が、pHT300由来の DNA 断片中 (これを EcoI¹ とする) と、pHT300PLE 由来の DNA 断片中 (これを EcoI² とする) とが所定に存在するが、このうち、EcoI¹ 切断部位に、EcoI リンカーが2個挿入されたものが、pHT300.2PLE (4,087bp) である。

この pHT300.2PLE は、挿入された2個の EcoI リンカーにより、新たに EcoI 切断部位及び EcoI 制限部位が形成されると共に、EcoI¹ 切断部位を消失するが、テトラサイクリン耐性遺伝子中の EcoI¹ は残存しているため、菌株 pHT300.2PLE による形質転換体は、テトラサイクリン耐性を示す。

pHT300.2PLE の製作工程及び pHT300.2PLE の制限酵素地図を、各々、第2図及び第3図に示す。

本発明の分子量マーカーの構成要素である pHT300PLE 及び pHT300.2PLE の各制限 A~I と、相違する分子量との関係を表1に示す。

表 1
(単位:bp)

酵素 制限	pHT300PLE Size (bp)	pHT300PLE Size (bp)	pHT300.2PLE Size (bp)
A	4,079	—	—
B	—	2,016	—
C	—	1,300	1,300
D	—	—	1,107
E	—	—	920
F	—	658	658
G	—	489	489
H	—	207	207
I	—	80	80

され、これにより得られたDNA断片を、適宜の割合で混合することにより、目的の分子量マーカーが製作される。

そして、例えば、前記 A、及び B 配位の DNA断片を、1:2:10の割合で混合して、製した分子量マーカーを1%アガロースゲル電気泳動により泳動テストした結果 (第4図A、レーン2参照) から確認されるように、本発明の分子量マーカーは、1000bpの高分子量領域から、80bpの低分子量領域にわたって、適宜に分散分布した本発明の明瞭なバンドの形成が可能であるという従来製品にみられない顕著な効果を有することが判明した。

また、DNA断片作製のための出発材料としての pHT300PLE 及び pHT300.2PLE は、大腸菌 (E. coli) によるマルチコピーベクターとして、簡便な処理により、きわめて高収率の生産が可能であることから、生産コストの面に関してもそのコスト低減効果は絶大である。

<実施例>

以下に、実施例を記載して、更に、本発明について具体的に説明するが、本発明は、いうまでもなく前記実施例の範囲に限定されるものではない。

(1) pHT300.7PLE の EcoI 切断部位の保持及び EcoI リンカーの挿入 (pHT300.2PLE の作製)

53μl の pHT300.7PLE DNA (100 μg/μl) (J. Genet. 11, 405-408 (1985) 参照) に、5.7 μl の10倍濃度緩衝液 (1M Tris-HCl (pH 7.8), 70mM NaCl, 70mM β-メルカプトエタノール, 500mM NaCl) を加えた後、EcoI (2.5 μ/μl) を2 μl 添加し、37℃、30分間反応させた。70℃で5分間加熱することにより反応を停止させた後、1%低融点アガロースゲル (3% 量比製、1 μg/μl エチジウムブロマイド含有) 電気泳動を行い、EcoI により1ヶ所が切断された分子量的 2.0 kb のバンドを切り出した。

pH 8.0))を加え、37℃の浴槽中で溶かしした後、室温までさまし、等量のフェノールを加えてよく攪とうした。次に、室温で 10000rpm、3 分間の遠心分離処理を施した後、80% を含む水層を採取し、再び等量 フェノールを加え、前記処理を繰返し、80% を含む 水層を採取した。続いて、これに 200 μ l の緩衝液 (50mM Tris, 10mM EDTA, 100mM NaCl (pH 8.0))を加え、更に全量の 2 倍量の -20℃ の冷エタノールを加え、-20℃、30 分間冷却した。これに 0℃、10000rpm、5 分間の遠心分離を施し、80% 沈降物を再び -20℃ エタノールで洗浄した後、再度、0℃、10000rpm、2 分間の遠心分離を施し、上澄のエタノールを捨て、沈降物中に残っているエタノールを完全に蒸発させた。ここで、得られた DNA に、5 μ l の緩衝液を加えて DNA を溶解し、10 倍濃度の T4 DNA ポリメラーゼ緩衝液 (570mM Tris-HCl (pH 8.0), 87 mM MgCl₂, 70mM β -メルカプトエタノール)

5 μ l の T4 DNA ポリメラーゼを 0.5 μ l 加え、37℃で 15 分間、反応させた。更に、200 μ l の 50mM Tris-HCl (pH 8.0) - 10mM EDTA - 1M NaCl を加えた後、フェノールを加えて沈降を失効させた。次いで、前記の冷エタノール沈降法より DNA を回収した。

ここで、得られた DNA に 2.0 μ l の緩衝液を加えて溶解させ、[1] リンカー [4 (pCCTCGAAGG) / 塩基当量 (塩) 濃、0.01 - 0.02 / μ l] を 1 μ l 加え、3 μ l の 10mM ATP、3 μ l の 100mM グタメスレート、3 μ l の 500mM Tris-HCl (pH 7.0) - 50mM MgCl₂ を加え、更に、3 μ l の T4 DNA リガーゼを 1 μ l 加えた。15℃で 3 時間の反応を行かせた後、120 μ l の緩衝液を加え全量を 150 μ l とした。

(2) 大腸菌の形質転換

前記 (1) 記載の処理で得られたプラスミド DNA 150 μ l (約 0.5 μ g) に、150 μ l の大腸菌

([2. cell] K12 C800 株, Jpn. J. Genet. [3], 22 8-248 (1988) 参照) のコンピテント細胞を加え、0℃、10 分間放置した後、0.7 μ l の λ -プロスを加えて、37℃、1 時間培養した。次いで、この培養液を λ -プロスに 1.5 倍の率又と 20 μ g / μ l のテトラサイクリンを添加して成る率又増地の液面に散布して、37℃で一晩培養した。この率又増地上にコロニーを形成した 12 株の形質転換体について、個有プラスミドの大きさを調べた。

(3) プラスミドの抽出と分子量の測定及び

1. λ -プロス増地の処理

pBT200-7PLS の [1] 形質転換は、テトラサイクリン感受性因子 λ 中に位置していることから、前記 (1) 記載の処理で [1] 形質転換を誘発すると、テトラサイクリン感受性になることから、テトラサイクリンを添加した λ -プロス率又増地上では、形質転換体の生育は見られない。そこで、[1] 形質転換体が感染していてテトラサイクリン感受性を示す形質転換体からプラスミドを抽出し、新たに [1] 形質転換体が形成されたプラスミドを

選別した。

すなわち、前記 (2) 記載の処理で得られた形質転換体を 5 μ l の λ -プロスで一晩培養後、遠心分離処理により濃縮し、2 μ l の 20mM Tris - 10mM EDTA (pH 8.0) に懸濁し、0.2 μ l の 0.2 μ g / μ l リゾチーム - 0.05 μ g / μ l RNase を加えて室温で 5 分間の反応を行った後、0.2 μ l の 0.2 % SDS 溶液を加え室温で 2 分間反応させ、0℃、10 分間放置後、この溶液に 20,000rpm、0℃、10 分間の遠心分離処理を施した。分離された上澄に緩衝液で溶解したフェノールを等量加え、よく攪とうした。更に、これを 15,000rpm、室温、3 分間の遠心分離処理を施し、80% を含む水層を採取し、15 μ l ずつ 0.5 % アガロースゲル電気泳動にかけて、その分子量を測定した。その結果、12 株の形質転換体の個有するプラスミドは、全ての約 3.0kb であった。

次に、この 12 株の形質転換体の個有するプラスミドのうち、目的どおり [1] 形質転換体が形成されたものをさがすために、後述に使用された液りの、80% を含む水層から冷エタノール法により DNA

0.10N EDTA(pH7.4) を加えて溶解した。

このプラスミドDNA 10 μ l に、2倍濃度緩衝液 (200m Tris-HCl(pH7.6), 140m NaCl, 140m β -メルカプトエタノール, 100m NaCl) を10 μ l 加えた後、更に、12 μ g/ μ l λ 11を1 μ l 添加し、これを37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた。そして、70 $^{\circ}$ C、5分間 加熱処理により、この反応を停止させ、全量を0.8%アガロースゲルで電気泳動させた。その結果、 λ 11で切断されたプラスミドDNA が1条帯で採取された。

続いて、この採取されたプラスミドDNA 10 μ l に2倍濃度緩衝液 (200m Tris-HCl (pH7.6), 140m NaCl, 140m β -メルカプトエタノール, 100m NaCl) を10 μ l 加え、そこに0.5 μ g/ μ l の λ 12と12 μ g/ μ lの λ 11を、各々1 μ l 単独又は混合添加し、これを37 $^{\circ}$ C、30分間反応させた後、70 $^{\circ}$ C、5分間の加熱処理により、この反応を停止させ、全量を0.8%アガロースゲルで電気泳動させた。その結果、目的どおり、 λ 12で切断

されたものである(第2図、第3図参照)。

(4) pHT300PLE 及びpHT300,2PLE の断片の 混合によるDNA 分子量マーカーの作成

前記(3)記載の処理で得られたpHT300,2PLE を常法により λ 12 で切断して得られた7個の断片(第4図B、レーン1)と、pHT300PLE (Jp a.J.Gencl.11, 235-242(1985) 参照) を常法により、 λ 12 及び λ 11 で各々切断して得られた8個の断片(第4図B、レーン2)及び1個の断片(第4図B、レーン3)とを、各々、10:2:1の混合割合で混合して、目的の分子量マーカーを得た。

アガロースゲル(1%)電気泳動の泳動バンド(第4図A、レーン2のA~I)から明らかにように、本発明の分子量マーカーは、約8,000bp の高分子量領域から800bpの低分子量領域にわたる広分子量領域に高濃度に分岐分布したDNA 断片による明確なバンドを形成し得る優れた特性を有するものであることが確認された。

比較対象として、従来の分子量マーカーの ϕ X

174RFの断片及び λ ファージDNAの λ 114

で切断した断片のAガロースゲル(1%)電気泳動による泳動バンドを参照してみると、 ϕ X 174RF 分子量マーカーは、低分子量領域で優れているものの、アガロースゲル(1%)電気泳動では、バンドa、f、g、h等が重なっているため、その分別が不明瞭な点があり(第4図A、レーン1、a~h)、また、 λ ファージDNA分子量マーカーは、高分子量領域にて限定的に有るものである(第4図A、レーン3)ことから、本発明の分子量マーカーは、その分岐分布領域の広さという点で優れたものであることが明らかである。

更に、本発明の分子量マーカーの作製材料であるpHT300PLE 及びpHT300,2PLE は、大腸菌(*E. coli* K12 C800 株)を宿主として大量生産が容易であることから、生産コストの面でも極めて優れた結果を奏することが確認された。

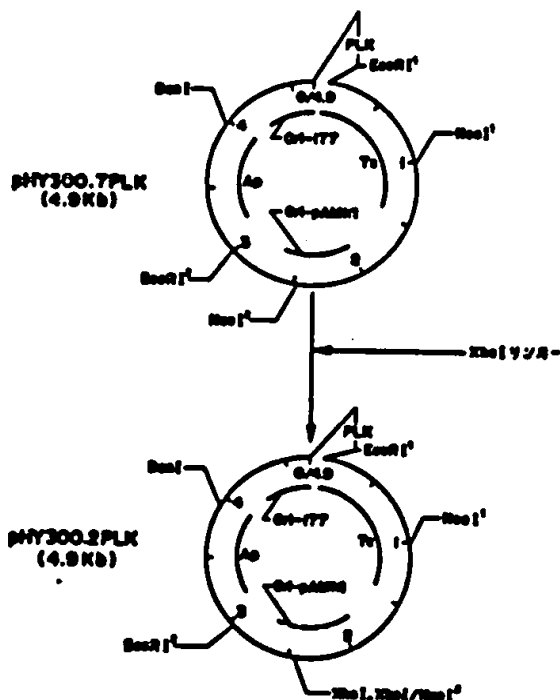
更に、本発明の分子量マーカーの作製材料であるpHT300PLE 及びpHT300,2PLE は、大腸菌(*E. coli* K12 C800 株)を宿主として大量生産が容易であることから、生産コストの面でも極めて優れた結果を奏することが確認された。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、プラスミドpHT300PLE の制限酵素地

第3圖は、ガラス100g、HY300.2PLR 製成師資、
地味を覆わす。

第4図は、アガロースゲル(1%)電気泳動による泳動結果として、バンドを示す写真であり、同図のAにおいて、レーン1は、 ϕ X174RFの λ_{12} 第切断片(a~b)を、レーン2は、本発明の分子量マーカー(A~I)を、レーン3は、AファージDNAの λ_{12} 第の切断片を、そして、同図Bにおいて、レーン1は、pBT300.2PLEの λ_{12} 第切断片を、レーン2は、pBT300PLEの λ_{12} 第切断片を、レーン3は、pBT300PLEの λ_{12} 第切断片を、各々置かず。

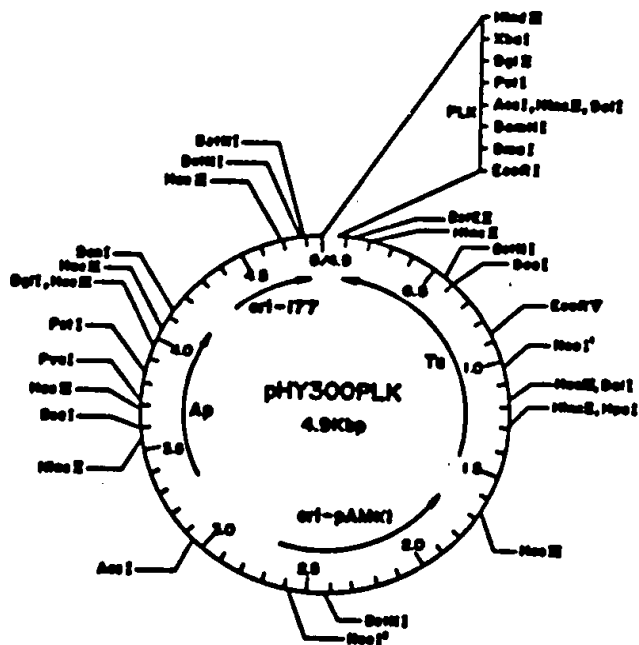


特許出願人 株式会社 ヤマト本社

代 理 人 弁 理 士 尾 崎 光 三



第 1 章



0457

0458

明細書の第18頁第7行
「よる放電結果として ……写真であり。」を
「よる放電結果としてのバンドを示す電子顕微鏡
写真であり。」に修正する。

昭和62年11月12日

特許庁長官 小川 邦 夫 閣

1. 事件の表示
昭和61年 特許願 第148891号

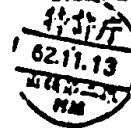
2. 発明の名称
DNAの分子量測定用標準マーカ-

3. 修正をする者
事件との関係 許出願人
居 所 東京都港区東新橋1丁目1番13号
(000) 株式会社 ヤタルト本社
職 名 取締役社長 飯 田 尚 巳

4. 代理人
住 所 東京都渋谷区道玄坂1丁目20番2号
カリエンタル道玄坂80
氏 名 弁護士 (0100) 尾 崎 光 三

5. 修正命令の日付 昭和62年10月7日
(昭和62年10月27日付発達)
6. 修正により増加する発明の数 0

7. 修正の対象 明細書の「図面の簡単な説明」の欄
及び図面(第4図)
8. 修正の内容 別紙の通り



8. 修正の内容

(1) 明細書の「図面の簡単な説明」の欄の記載
を以下のように修正する。

(1) 第18頁第6行~同第7行

「第4図は…写真であり。」を
「第4図は、アガロースゲル(1%)電気泳動
による放電結果としてのバンドを顕写した説
明図であり。」に修正する。

0459